

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成24年5月25日現在

機関番号：12601

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2010～2011

課題番号：22650223

研究課題名（和文）表面抗原マーカーを介した癌幹細胞のエピジェネティック制御機構の解明

研究課題名（英文）To determine the epigenetic regulatory mechanism of cancer stem cells by cell surface molecules.

研究代表者

森本 幾夫（MORIMOTO CHIKAO）

東京大学・医科学研究所・教授

研究者番号：30119028

研究成果の概要（和文）：CD9 の B-ALL におけるがん幹細胞特性を検討した。患者検体では CD9 は B-ALL のほとんどで発現し、CD34 と関連した。CD9 のノックダウンは白血病誘発能力を減少させ、Src の発現やチロシンリン酸化に影響を与え、ヒストン脱ユビキチン酵素の USP22 の発現を減少させた。悪性中皮腫で CD24 と CD26 は癌幹細胞特性を別個に制御し、CD26 と USP22 の発現も密に関連していた。このことから CD9、CD24 及び CD26 はそれぞれが治療ターゲットになる可能性が示唆された。

研究成果の概要（英文）：In the current study, we performed more detailed analysis of CD9 function for the cancer stem cell properties of B-ALL. In patient samples, CD9 was expressed in the most cases of B-ALL cells with significant correlation of CD34-expression. Knockdown of CD9 remarkably reduced the leukemogenic potential and affected the expression and tyrosine phosphorylation of Src family protein and reduced the expression of histone-deubiquitinase USP22. In malignant mesothelioma our results showed that CD24 and CD26 differentially regulated the cancer stem cell potentials of MM and also CD26 expression closely correlated with expression of USP22. These results suggest that CD24, CD9 and CD26 could be the promising target for CSC-oriented therapy.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	1,500,000	0	1,500,000
2011年度	1,400,000	420,000	1,820,000
年度			
年度			
年度			
総計	2,900,000	420,000	3,320,000

研究分野：総合領域

科研費の分科・細目：腫瘍学・発がん

キーワード：がん幹細胞、エピジェネティクス、B-ALL、悪性中皮腫、CD9、CD24、CD26、USP22

1. 研究開始当初の背景

最近の研究で、急性骨髄性白血病だけでなく固形腫瘍でも癌幹細胞の存在が続々と報告されている。我々の研究では、急性リンパ性白血病(ALL)のうち、CD9 が B-ALL で(西田/森本, BBRC, 382, 52-62, 2009)、CD90 と CD110

が T-ALL で(山崎/森本, 383, 172-7, BBRC, 2009)、癌幹細胞特性と相関するマーカーであることがわかり、その結果癌幹細胞を分離してその特性を解析することが可能となった。一方、癌における遺伝子発現のエピジェネティック制御が最近注目されている。DNA

のメチル化とヒストン蛋白の修飾によってこの制御が行われるが、ヒストン修飾には、メチル化、リン酸化、アセチル化、SUMO化、ユビキチン化がある。ヒストン修飾でのユビキチン化は、ポリユビキチン化ではなく、モノユビキチン化であるため蛋白分解は起こらない。モノユビキチン化の標的はH2AとH2Bである。H2Bの場合、H2BユビキチンリガーゼRNP20は癌抑制遺伝子p53と結合し、グリオーマの増殖に関与する。また、H2Bの脱ユビキチン酵素USP22は、癌幹細胞特性と関連する遺伝子群11個(Bmi1を含む)の一つとして同定され、転移・再発・死亡との相関が示された。USP22は細胞周期やMycによる癌化に関与していることもわかった(Zhang, Molecular Cell, 2008)。

他方、我々の共同研究者のDr. Xu(Nevada Cancer Institute)らの研究では、グルコース添加により解糖系を介してH2Bのモノユビキチン化が亢進することを発見し、代謝系がヒストン修飾に影響することを始めて観察した。我々の予備的な実験で、B-ALLの癌幹細胞マーカーのCD9をsiRNAでノックダウンすると、USP22が減少して、H2Bのモノユビキチン化が亢進することが分かった。一般に癌細胞(特に癌幹細胞)は、血管からの酸素供給が不足しており、低酸素状態に置かれるため、解糖系代謝が亢進することが知られている(ワールブルグ効果)。このため、ヒストンユビキチン化、解糖系代謝、癌幹細胞特性の三者が、USP22を介して密接に関わっている可能性が示唆された。

2. 研究の目的

表面抗原は細胞外からの刺激を細胞内に伝達する役割を担っている。ALLにおいて癌幹細胞特異的表面マーカーは、どのようなシグナル伝達系を介して、どのようなヒストン修飾酵素の活性を変化させ、癌幹細胞に重要な遺伝子の活性を変化させるかを、その分子機構について明らかにする。そして、外的要因(代謝物質、agonist/antagonistなどの化学物質、ペプチド/蛋白因子、表面抗原)が、表面抗原とヒストンの修飾を介して、癌幹細胞特性を増強/減弱する可能性を示せるかを調べる。もし可能なら腫瘍抑制効果などを調べ、新しい癌治療のヒントとなるかを検討する。

3. 研究の方法

CD9が単なる目印ではなく、細胞外刺激を細胞内に伝え、癌幹細胞特性に重要な役割をもつ分子であるかを、過剰発現/ノックダウン実験で明らかにする。次いで、CD9からどのようなシグナル伝達系を経由してUSP22の発現調節を行い、ヒストンH2Bのユビキチン修飾に関わっているかを、CD9とUSP22の過剰

発現/ノックダウンを行い、それらの遺伝子発現をマイクロアレイで比較する。変動する遺伝子が発見されれば、その新規蛋白の機能を解析する。他のヒストン修飾についても同様に調べる。さらに、他の癌幹細胞マーカーでも各種のヒストン修飾が起こっているかを同様の方法を用いて調べる。外的要因として、これらの表面マーカーのリガンドや、agonist/antagonistを与えたときに、癌幹細胞特性を増強/減弱したり、癌幹細胞分画が増減するかも調べる。これら一連の網羅的な研究により、表面マーカーを介したヒストン修飾による癌幹細胞特性のエピジェネティック制御の全貌を明らかにし、新規の癌幹細胞シグナル系をヒントにした、癌幹細胞標的治療の実現を目指していく。

4. 研究成果

①表面抗原は細胞外からの刺激を細胞内に伝達する役割を担っている。ALLにおいてがん幹細胞特異的表面マーカーはどのようなシグナル伝達系を介して、どのようなヒストン修飾酵素の活性を変化させがん幹細胞に重要な遺伝子の活性を変化させるかその分子機構について明らかにした。我々は以前CD9はB細胞型ALL細胞株に多様に発現され、CD9陽性株は不均等分裂を示し、CD9陰性細胞株と比して免疫不全マウスで腫瘍形成能も高い。さらにCD9細胞は免疫不全マウスで連続移植が可能であることから、CD9陽性細胞は自己複製能力を保持していることを示唆している。CD9分子のB-ALLにおけるがん幹細胞特性についてさらに詳しい解析を行った。患者検体ではCD9はB-ALLのほとんどの症例で発現し、CD34の発現と関連していた。遺伝子発現解析の結果、白血病誘発性融合蛋白やSrc族蛋白はCD9陽性集団において有意に調節されていた。さらにCD9陽性細胞は薬剤抵抗性を示したが、これらの細胞はCD9抗体によりその増殖は抑制された。またCD9発現のノックダウンは白血病誘発潜在能力を減少させた。さらにCD9の遺伝子削除はSrc族の発現やそのチロシンリン酸化に影響を与え、またヒストン脱ユビキチン酵素のUSP22の発現を減少させた。このようにCD9はいくつかのシグナル伝達経路やB-ALLのがん幹細胞を調節しているエピジェネティック制御に連結している可能性も示唆した。

②我々は過去にCD26、CD24、CD9などのいくつかの細胞表面分子は悪性上皮腫のがん幹細胞特性と関連することを報告してきた。しかしこれらのマーカーはどのようなシグナル伝達系を介し、いかなるヒストン修飾酵素の活性を変化させ、癌幹細胞に重要な遺伝子活性を誘導させるかその分子機構については詳細にされていない。この目的のために我々はCD24及びCD26陽性の悪性上皮腫株を

用いてその癌幹細胞特性を検討した。まずそれぞれの RNAi を用いてでノックダウン細胞を確立したが、これらのマーカーは in vitro での化学療法剤抵抗性、増殖及び浸潤能力と有意に相関していた。興味深いことに、例えば Meso-1 株は CD24 及び CD26 陽性であるが、これら 2 つのマーカーはそれぞれが異なった癌幹細胞特性と相関していた。さらにマイクロアレイでこれらマーカーの下流シグナルを解析したところ、これらの発現はいくつかのがん関連遺伝子と相関した。EGF 刺激による ERK のリン酸化は CD26 の発現により影響されたが、CD24 の発現には影響されなかった。さらに CD26 分子の発現とヒストン脱ユビキチン酵素の USP22 の発現は密に関連していることも明らかになった。これらの結果から CD24 と CD26 分子は癌幹細胞特性を個別に制御しており、それぞれ癌幹細胞に基づく有望な治療法ターゲットになる可能性が示唆された。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 11 件)

① Yamazaki H, Naito M, Ghani FI, Dang NH, Iwata S, Morimoto C. Characterization of cancer stem cell properties of CD24 and CD26-positive human malignant mesothelioma cells. *Biochem Biophys Res Commun.* 2012; 419: 529-36.
DOI: 10.1016/j.bbrc.2012.02.054

② Aoe K, Amatya VJ, Fujimoto N, Ohnuma K, Hosono O, Hiraki A, Fujii M, Yamada T, Dang NH, Takeshima Y, Inai K, Kishimoto T, Morimoto C. CD26 overexpression is associated with prolonged survival and enhanced chemosensitivity in malignant pleural mesothelioma. *Clin Cancer Res.* 2012; 18: 1447-1456.
DOI: 10.1158/1078-0432.CCR-11-1990

③ Amatya VJ, Takeshima Y, Kushitani K, Yamada T, Morimoto C, Inai K. Overexpression of CD26/DPPIV in mesothelioma tissue and mesothelioma cell lines. *Oncol Rep.* 2011; 26: 1369-1375.
DOI: 10.3892/or.2011.1449

④ Yamazaki H, Wilson Xu C, Naito M, Nishida H, Okamoto T, Ghani FI, Iwata S, Inukai T, Sugita K, Morimoto C. Regulation of cancer stem cell properties by CD9 in human B-acute lymphoblastic leukemia. *Biochem Biophys Res Commun.* 2011; 409:

14-21.

DOI: 10.1016/j.bbrc.2011.04.098

⑤ Shirakawa J, Fujii H, Ohnuma K, Sato K, Ito Y, Kaji M, Sakamoto E, Koganei M, Sasaki H, Nagashima Y, Amo K, Aoki K, Morimoto C, Takeda E, Terauchi Y. Diet-Induced Adipose Tissue Inflammation and Liver Steatosis Are Prevented by DPP-4 Inhibition in Diabetic Mice. *Diabetes.* 2011; 60: 1246-57.
DOI: 10.2337/db10-1338

⑥ Shimizu N, Yoshikawa N, Ito N, Maruyama T, Suzuki Y, Takeda S, Nakae J, Tagata Y, Nishitani S, Takehana K, Sano M, Fukuda K, Suematsu M, Morimoto C, Tanaka H. Crosstalk between glucocorticoid receptor and nutritional sensor mTOR in skeletal muscle. *Cell Metab.* 2011; 13: 170-82.
DOI: 10.1016/j.cmet.2011.01.001

⑦ Abe M, Havre PA, Urasaki Y, Ohnuma K, Morimoto C, Dang LH, Dang NH. Mechanisms of confluence-dependent expression of CD26 in colon cancer cell lines. *BMC Cancer.* 2011; 11: 51.
DOI: 10.1186/1471-2407-11-51

⑧ Ghani FI, Yamazaki H, Iwata S, Okamoto T, Aoe K, Okabe K, Mimura Y, Fujimoto N, Kishimoto T, Yamada T, Xu CW, Morimoto C. Identification of cancer stem cell markers in human malignant mesothelioma cells. *Biochem Biophys Res Commun.* 2011; 404: 735-42.
DOI: 10.1016/j.bbrc.2010.12.054

⑨ Ohnuma K, Morimoto C. Targeted therapy by monoclonal antibodies. *Nippon Rinsho.* 2010; 68: 1841-7.

⑩ Takasawa W, Ohnuma K, Hatano R, Endo Y, Dang NH, Morimoto C. Inhibition of dipeptidyl peptidase 4 regulates microvascular endothelial growth induced by inflammatory cytokines. *Biochem Biophys Res Commun.* 2010; 401: 7-12.
DOI: 10.1016/j.bbrc.2010.08.112

⑪ Arimoto-Miyamoto K, Kadowaki N, Kitawaki T, Iwata S, Morimoto C, Uchiyama T. Optimal stimulation for CD70 induction on human monocyte-derived dendritic cells and the importance of CD70 in naive CD4(+) T-cell differentiation. *Immunology.* 2010; 130: 137-49.

〔学会発表〕（計1件）

① Morimoto C. The Current Status of Drug Development and the Role of Clinical Trial Centers in Japan. International Symposium of Clinical Trial. October 7th, 2011. Jeju, Korea.

〔図書〕（計3件）

① Ohnuma K, Hosono O, Dang NH, Morimoto C. Dipeptidyl peptidase in autoimmune pathophysiology. Adv Clin Chem. 2011; 53: 51-84.

② Yamazaki H and Morimoto C. Stem cell property for T-cell malignancy. T-Cell Malignancies: Recent Developments and Novel Therapeutic Approaches. Edited by Dang NH. 2010. pp197-202.

③ Havre PA, Dang LH, Abe M, Urasaki Y, Ohnuma K, Morimoto C, Dang NH. The role of CD26 in T-cell biology and T-cell malignancies. T-Cell Malignancies: Recent Developments and Novel Therapeutic Approaches. Edited by Dang NH. 2010. pp37-54.

6. 研究組織

(1) 研究代表者

森本 幾夫 (MORIMOTO CHIKAO)
東京大学・医科学研究所・教授
研究者番号：30119028

(2) 研究分担者

細野 治 (HOSONO OSAMU)
東京大学・医科学研究所・講師
研究者番号：50190210

岩田 哲史 (IWATA SATOSHI)
東京大学・医科学研究所・特任講師
研究者番号：00396871

(3) 連携研究者

なし